

姜黄素对脂多糖诱导的小鼠抑郁样行为的影响及机制

薄秀梅¹, 贺玲¹, 张荣丽², 杜赛君³, 徐洲⁴

摘要 目的 研究姜黄素(CUR)抗脂多糖(LPS)诱导的小鼠抑郁作用及机制。方法 取雄性ICR小鼠30只,分为Control组、LPS组、CUR组,每组10只。采用单剂量腹腔注射LPS 1 mg/kg建立小鼠抑郁模型。通过糖水偏好实验(SPT)、旷场实验(OFT)和强迫游泳实验(FST)对抑郁小鼠进行行为学评价;尼氏染色实验观察小鼠前额叶皮质(PFC)神经元胞体中的尼氏体(Nissl body)变化情况;Western blot实验检测小鼠PFC区c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化JNK(p-JNK)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、凋亡相关蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达情况。结果 CUR组小鼠糖水偏好度、旷场活动总距离和穿越中心格次数均高于LPS组($P < 0.05$),FST中小鼠不动时间低于LPS组($P < 0.05$)。尼氏染色实验结果显示CUR组小鼠神经细胞数多于LPS组($P < 0.05$)。Western blot实验结果显示,与LPS组比较,CUR组小鼠PFC区p-JNK、Bax、Caspase-3表达降低,Bcl-2表达升高($P < 0.05$)。结论 姜黄素可以改善脂多糖诱导的小鼠抑郁行为,减轻神经细胞的损伤,其可能与抑制JNK磷酸化,降低促凋亡蛋白Bax、Caspase-3,提高抑凋亡蛋白Bcl-2的表达有关。

关键词 姜黄素;脂多糖;抑郁症;前额叶皮质;p-JNK;凋亡中图分类号 R 741

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1064-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.015

抑郁症是以情绪低落、精神萎靡和自主活动减少为临床特征的一类精神疾病。目前传统的抗抑郁药虽有一定疗效,但副作用较大,如导致性功能障碍、降低血压、增加体质量等^[1]。因此,从植物中寻找高效、低毒的天然抗抑郁活性成分成为治疗抑郁症的研究热点。动物体内注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可诱发类似抑郁的行为,常作为研究

炎症诱导抑郁症的模型^[2]。C-Jun氨基末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路成为抑郁症研究和治疗的新靶标^[3],在神经炎症、氧化应激、大脑缺血等胞外信号刺激下,JNK被激活,作用于下游底物c-Jun等,引起促凋亡蛋白的活化。在抑郁模型动物中,Caspase-3、Bax表达增加,Bcl-2的表达降低,最终通过线粒体凋亡途径诱发细胞凋亡^[4-5]。

姜黄素(curcumin, CUR)的分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$,最早是从姜黄中分离出来的多酚类化合物。研究^[6]表明,姜黄素具有抗炎抗氧化等多种功效,可以减少在强迫游泳和悬尾实验中的不动时间,还可以抑制神经细胞的凋亡发挥神经保护作用^[7]。关于姜黄素对脂多糖诱导的小鼠抑郁行为的影响及相应机制未见报道。该研究采用腹腔注射LPS制作小鼠抑郁模型,观察姜黄素对小鼠抑郁行为的改善作用,并进一步探索其是否通过降低JNK磷酸化及抑制神经细胞凋亡发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性健康ICR小鼠30只,体质量15~20 g,由徐州医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证编号:SYXK(苏)2015-0030。实验前适应性饲养1周,饲养环境温度20~25℃,期间自由饮食饮水。

1.1.2 主要试剂药品 姜黄素(纯度98%)购自郑州荔诺生物科技有限公司;鼠抗β-肌动蛋白(β-actin)、JNK、p-JNK、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine-aspartic acid protease-3, Caspase-3)多克隆抗体、兔抗B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、凋亡相关蛋白Bcl-2相关X蛋白(Bax)多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司;Western blot相关试剂盒购自上海碧云天公司;尼氏染色液购自北京索莱宝科技有限公司;LPS、荧光二抗购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 模型制作和给药方法 腹腔注射LPS(1 mg/kg)制作小鼠抑郁模型。选取30只小鼠随机分为Control组(对照组)、LPS组(模型组)和CUR组,

2020-03-25 接收

基金项目:江苏省六大人才高峰高层次人才项目(编号:YY-042);徐州市科技计划项目(KC16SG250)

作者单位:徐州医科大学¹基础医学院国家级实验教学示范中心、²化学教研室、³生命科学学院、⁴江苏省新药研究与临床药学重点实验室 徐州 221004

作者简介:薄秀梅,女,硕士研究生;

徐洲,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: xuzhou@xzhmu.edu.cn

每组 10 只。CUR 组小鼠每日灌胃给予姜黄素 40 mg/kg, Control 组给予等剂量生理盐水。5 周后, LPS 组、CUR 组小鼠单次腹腔注射 LPS、Control 组给予等剂量生理盐水, 24 h 后进行行为学测试及蛋白表达检测。

1.2.2 糖水偏好实验 糖水偏好度是评估动物抑郁行为的重要指标之一, 参照文献^[8]对小鼠进行糖水/纯水消耗实验。小鼠单笼饲养, 在 LPS 或生理盐水注射前, 称量好清水瓶与糖水(1%蔗糖溶液)的初始重量, 24 h 后再次称量, 并计算实验前后小鼠清水和糖水消耗量。糖水偏好度计算公式: 糖水偏好度(%) = 糖水消耗量/总液体消耗量 × 100%。

1.2.3 旷场实验 旷场实验在黑色塑料敞箱中进行, 实验时每次将一只小鼠放入敞箱的正中央, 应用 Anaze Y 软件记录 10 min 内小鼠的运动距离和穿越中心格的次数。

1.2.4 强迫游泳实验 将小鼠放入高 30 cm, 直径 11 cm, 水深 15 cm 的圆形透明游泳桶中, 桶内水温(25 ± 1) °C, 每只小鼠预游泳 2 min 以适应环境。用 ZH-QPT 系统观察并记录其行为学指标 5 min, 用 Any-maze system 软件记录其静止不动的时间。

1.2.5 尼氏染色实验 取小鼠大脑 PFC 区, 进行石蜡包埋, 经切片(5 μm)、漂片、贴片、烘片后, 二甲苯脱蜡, 用 0.1% 尼氏染色液在 37 °C 环境下染色 50 min, 染色结束后经洗涤、脱水、透明、封片, 显微镜观察神经细胞受损情况, 同时每张切片取 6 个视野计算 1 mm² 神经细胞存活个数, 取平均值。

1.2.6 蛋白免疫印迹实验 取小鼠大脑 PFC 区, 根据试剂盒说明书提取总蛋白, 取 50 μg 总蛋白经 SDS-PAGE 电泳(110 V, 200 min)、转膜、封闭、洗膜, 加一抗 4 °C 过夜, 洗膜后, 加相应二抗 25 °C 避光孵育 2 h, 洗膜后扫描并拍照, 应用软件 Image J 分析蛋白灰度值, 将目的蛋白与非磷酸化蛋白或 β-actin 灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 统计分析采用 GraphPad Prism 4.0 软件完成。所有的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间总体比较采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, Bonferroni 校正法。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 姜黄素对抑郁小鼠糖水消耗的影响 与 Control 组(61.30 ± 2.05) 相比, LPS 组(44.10 ± 3.92) 小鼠糖水偏好度降低(*P* < 0.05); 与 LPS 组相比,

CUR 组(58.67 ± 1.82) 糖水偏好度升高, 接近对照水平(*P* < 0.05)。

2.2 姜黄素对抑郁小鼠运动距离和穿格次数的影响 LPS 组小鼠出现抑郁症状, 表现为情绪低落, 活动量减少, 探索能力下降。而给予姜黄素后上述症状得到改善。统计分析显示, 与 Control 组相比, LPS 组小鼠活动总距离缩短, 穿越中心格次数减少(*P* < 0.05); 与 LPS 组相比, CUR 组小鼠运动距离明显增加, 穿越中心格次数增加(*P* < 0.05)。见表 1。

2.3 姜黄素对抑郁小鼠强迫游泳中不动时间的影响 与 Control 组相比, LPS 组小鼠不动时间延长(*P* < 0.05); 与 LPS 组相比, CUR 组小鼠不动时间缩短(*P* < 0.05), 见表 1。

表 1 姜黄素对抑郁模型小鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 10)

组别	活动距离(m)	穿格次数(次)	不动时间(s)
Control	25.23 ± 1.17	146.70 ± 7.10	70.67 ± 7.05
LPS	11.10 ± 0.87*	76.33 ± 9.45*	114.30 ± 9.74*
CUR	20.83 ± 0.64#	114.00 ± 11.00#	91.27 ± 10.00#
<i>F</i> 值	184.90	44.03	17.56
<i>P</i> 值	0.00	0.00	0.00

与 Control 组比较: * *P* < 0.05; 与 LPS 组比较: # *P* < 0.05

2.4 姜黄素对抑郁小鼠 PFC 区神经元的影响 尼氏体是神经元的特征性结构之一, 广泛存在于神经元的胞体和树突内, 与碱性染料结合, 显示出蓝紫色, 能反映细胞的存活状态。Control 组神经细胞胞体形态正常, 排列均匀, 胞质透明, 未见神经元损伤。LPS 组大部分细胞分布稀疏, 胞核固缩, 神经元损伤严重, 而 CUR 组只有少部分细胞损伤。细胞计数结果显示, 与 Control 组比较, LPS 组神经元细胞数量减少(*P* < 0.05)。与 LPS 组比较, CUR 组小鼠神经元损伤减轻, 细胞数量增加(*P* < 0.05)。见图 1。

2.5 姜黄素对抑郁小鼠 p-JNK/JNK 的影响 对 Western blot 结果进行分析, 计算各组 p-JNK 与 JNK 比值, 并以 Control 组为基数 1.00, 计算 LPS 组和 CUR 组与 Control 组的相对比值。与 Control 组比较, LPS 组 JNK 磷酸化水平升高, p-JNK/JNK 增加(3.01) (*P* < 0.05); 与 LPS 组比较, CUR 组 JNK 磷酸化水平降低, p-JNK/JNK 降低(1.86) (*P* < 0.05)。见图 2。

2.6 姜黄素对抑郁小鼠凋亡蛋白表达的影响 Western blot 结果条带分析表明, 与 Control 组相比, LPS 组 Bcl-2 蛋白表达降低而 Bax、Caspase-3 水平升高(*P* < 0.05); CUR 组 Bcl-2 蛋白表达升高, Bax、

Caspase-3 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

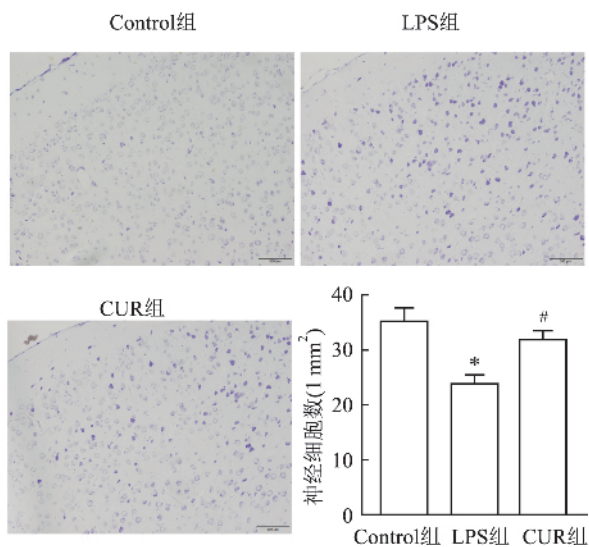


图1 姜黄素对抑郁小鼠神经细胞损伤的影响 ×200
与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

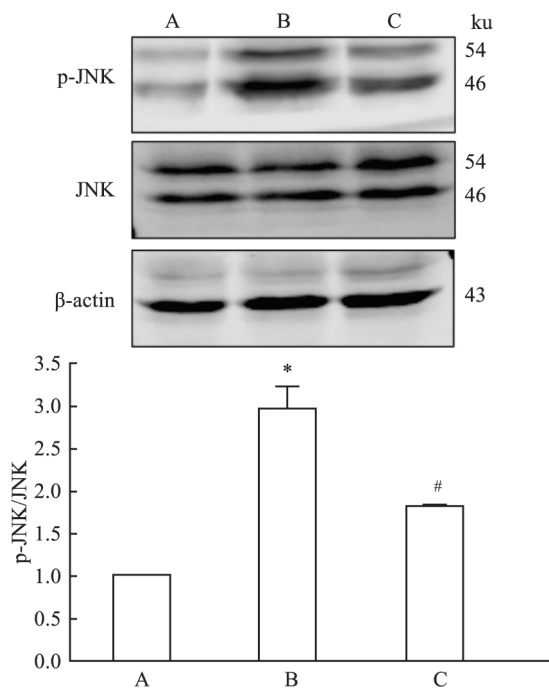


图2 姜黄素对抑郁小鼠 JNK 磷酸化水平的影响

A: Control 组; B: LPS 组; C: CUR 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

动物体内腹腔注射 LPS 诱导产生抑郁症,属于急性应激抑郁模型,且较低剂量更容易引发炎症反应,在旷场实验及暗场实验中出现自主活动减少等症状^[9],该研究利用单次腹腔注射 1.00 mg/kg LPS

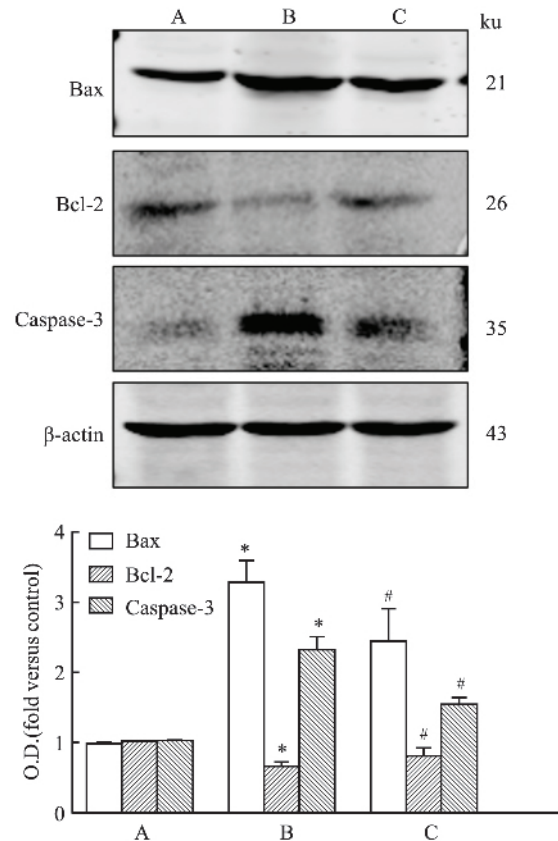


图3 姜黄素对抑郁小鼠凋亡蛋白表达的影响

A: Control 组; B: LPS 组; C: CUR 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

制作小鼠抑郁模型。结果显示,模型组小鼠表现出临床相似抑郁症状,行为学测试表现为: SPT 中糖水偏好度降低; OFT 中自主活动减少,运动距离变短,穿格次数减少; FST 中静止不动时间延长,快感降低等,表明模型制作成功,上述抑郁症状在姜黄素预防性给药的小鼠中明显得到改善。PFC 区是导致心境障碍的大脑区域之一,其功能变化在抑郁症发病过程中扮演重要角色^[5]。神经元内尼氏体的密度与神经元损伤程度密切相关,是评价神经元损伤程度的重要指标。该研究对 PFC 区组织形态学的改变进行了评估,结果表明,模型组小鼠的 PFC 区神经细胞松散,排列不规则,细胞固缩,尼氏体减少。而提前给予姜黄素治疗 CUR 组,神经元受损状况得到改善,提示姜黄素可以抑制 PFC 区神经细胞的损伤,从而保护神经细胞。

研究^[10]表明 LPS 刺激可提高小鼠 PFC 区的 JNK 磷酸化水平,导致细胞凋亡和炎症发生。JNK 被激活后, p-JNK 升高,同时降低凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,提高促凋亡蛋白 Bax 的水平,并进一步促进线粒体内细胞色素 c 释放到胞质,与凋亡酶激活因

子-1 相互作用,通过 ATP 的协助组成凋亡复合体,此复合体迅速结合并激活 Pro-Caspase-9,产生 Caspase-9 全酶,导致 Caspase-3 的表达明显升高,启动 Caspase 级联反应,通过线粒体途径诱发细胞凋亡。本研究结果显示 LPS 组小鼠 p-JNK 表达量显著升高,提前灌胃给予姜黄素可降低 p-JNK 的水平,提示姜黄素的抗抑郁作用可能与抑制 JNK 的磷酸化有关,由于 JNK 的激活受到抑制,某些基因表达或者新生蛋白质的合成受阻,相关凋亡途径被中断;进一步研究表明 LPS 组 Bax、Caspase-3 表达水平升高, Bcl-2 表达降低,而给予姜黄素后可逆转这一现象。这些研究结果提示,抑郁症的发生与 JNK 磷酸化的程度有关,这一观点与之前的研究结果一致, JNK 激活后诱导的神经细胞凋亡可能是抑郁症发病原因之一,而姜黄素正是通过抑制 p-JNK、降低促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平,从而阻止神经细胞的凋亡,达到抗抑郁效果。

姜黄是亚洲国家的常用食物,对人体健康有积极的作用,同时作为药物,在印度和中国治疗感染、抑郁症等疾病使用了几个世纪^[11]。在大鼠抑郁症模型中,使用姜黄素进行实验性饮食治疗,抑制了抑郁大鼠海马萎缩,提高了神经营养因子的水平,同时降低了 Caspase-3 的表达使抑郁症得到改善^[12-13]。Meta 分析表明长期补充姜黄素可能会改善患者的抑郁和焦虑症状,因此有学者建议将姜黄素作为饮食治疗^[14-15]。该研究采用的提前灌胃给予姜黄素属于实验性饮食治疗范畴,接近人们日常使用姜黄的生活习惯,使模型更具说服力。

综上所述, LPS 通过激活 JNK 诱导小鼠产生抑郁行为,姜黄素减轻小鼠的抑郁行为可能与降低 JNK 磷酸化,抑制细胞凋亡,提高神经细胞的存活有关。本实验部分揭示了姜黄素的抗抑郁作用及机制,为寻找抗抑郁药提供了新的思路和实验基础。

参考文献

- [1] Chung C. New perspectives on glutamate receptor antagonists as antidepressants[J]. *Arch Pharm Res*, 2012, 35(4): 573-7.
- [2] Jangra A, Lukhi M M, Sulakhiya K, et al. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 337-45.
- [3] Zhang J T, Lin W J. The JNK signaling pathway as a potential new target for depression (in Chinese) [J]. *Chin Sci Bull*, 2018, 63: 1998-2009.
- [4] 金齐颖, 吴红芳, 张园园, 等. 慢性不可预见性温和应激对大鼠海马星形胶质细胞凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1226-30, 1235.
- [5] Li J, Xu B, Chen Z, et al. PI3K/AKT/JNK/p38 signalling pathway-mediated neural apoptosis in the prefrontal cortex of mice is involved in the antidepressant-like effect of pioglitazone[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 2018, 45(6): 525-35.
- [6] Sundar D, Kumar S, Houreld N N, et al. Therapeutic potential and recent advances of curcumin in the treatment of aging-associated diseases[J]. *Molecules*, 2018, 23(4): 835.
- [7] Fan C, Song Q, Wang P, et al. Neuroprotective effects of curcumin on IL-1 β -induced neuronal apoptosis and depression-like behaviors caused by chronic stress in rats[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 516.
- [8] Zhou D, Zhang Z, Liu L, et al. The antidepressant-like effects of biperiden may involve BDNF/TrkB signaling-mediated BICC1 expression in the hippocampus and prefrontal cortex of mice[J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2017, 157: 47-57.
- [9] Wang Z, Li W, Chen J, et al. Proteomic analysis reveals energy metabolic dysfunction and neurogenesis in the prefrontal cortex of a lipopolysaccharide-induced mouse model of depression[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2): 1813-20.
- [10] Daniele S, Pozzo E D, Zappelli E, et al. Trazodone treatment protects neuronal-like cells from inflammatory insult by inhibiting NF- κ B, p38 and JNK[J]. *Cellular Signal*, 2015, 27: 1609-29.
- [11] Betül K, Nevîn Ş. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 57(13): 2889-95.
- [12] Borre Y E, Panagaki T, Koelink P J, et al. Neuroprotective and cognitive enhancing effects of a multi-targeted food intervention in an animal model of neurodegeneration and depression[J]. *Neuropharmacol* 2014, 79: 738-49.
- [13] Rinwa P, Kumar A, Garg S, et al. Suppression of neuroinflammatory and apoptotic signaling cascade by curcumin alone and in combination with piperine in rat model of olfactory bulbectomy induced depression[J]. *PLoS One*, 2014, 8(4): e61052.
- [14] Fusar-Poli L, Vozza L, Gabbadini A, et al. Curcumin for depression: a meta-analysis[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2019, 19: 1-11.
- [15] Dome P, Tombor L, Lazary J, et al. Natural health products, dietary minerals and over-the-counter medications as add on therapies to antidepressants in the treatment of major depressive disorder: a review[J]. *Brain Res Bull* 2019, 146: 51-78.

网络出版时间: 2020-6-29 11:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.016.html>

N-乙酰半胱氨酸对血管紧张素 II 诱导的 HK-2 细胞炎症相关因子的抑制作用

赵雅洁 季嘉玲 文先丽 李善文 张爱青 甘卫华

摘要 目的 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对血管紧张素 II (Ang II) 所诱导的 HK-2 细胞炎症相关因子的抑制作用。方法 将 HK-2 细胞分为四组(对照组、Ang II 组、NAC 组、Ang II + NAC 组),以 NAC (5 mmol/L)、Ang II (1 mmol) 处理细胞,于 48 h 后收集细胞,PCR 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白介素 6 (IL-6) mRNA 水平的变化;Western blot 法检测 TNF- α 、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、白介素 1 β

(IL-1 β) 蛋白的表达变化;免疫荧光法观察 TNF- α 的荧光表达分布情况。结果 与对照组相比,Ang II 组 HK-2 细胞内炎症因子蛋白(TNF- α 、MCP-1 和 IL-1 β)、mRNA (TNF- α 、IL-6) 表达上调,经 NAC 处理后,Ang II + NAC 组以上变化均减小,免疫荧光检测也显示相同结果。结论 NAC 能抑制 Ang II 诱导的 HK-2 细胞内炎症相关因子的表达。

关键词 N-乙酰半胱氨酸;血管紧张素 II;HK-2 细胞;炎症因子

中图分类号 R 459.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1068-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.016

2020-03-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81670650);江苏省自然科学基金(编号:BK20191082);南京市卫生计划科技发展专项资金项目(编号:YKK18193);南京市卫生青年人才(编号:QRX17106);江苏省妇幼健康科研项目(编号:F201855);江苏省妇幼健康重点人才项目(编号:FRC201737)

作者单位:南京医科大学第二附属医院儿肾科,南京 210003

作者简介:赵雅洁,女,硕士研究生;

甘卫华,女,博士,主任医师,教授,责任作者,E-mail: weihuagan@njmu.edu.cn

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者数逐年增多,成为影响公共健康的重要问题,增加了全球的社会经济负担^[1]。研究^[2]表明我国成人慢性肾脏病的发生率高达 10.8%。肾小管间质炎症

Effects and mechanism of curcumin on lipopolysaccharide-induced depressive like behavior in mice

Bo Xiumei¹, He Ling¹, Zhang Rongli², et al

(¹National Demonstration Center for Experimental Basic Medical Science Education,

²Dept of Chemistry, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To investigate the effects of curcumin (CUR) on lipopolysaccharide (LPS)-induced depression in mice and its mechanism. **Methods** Thirty male ICR mice were randomly divided into control group, LPS group and CUR group, ten mice in each group. The depression model was established by intraperitoneal injection of LPS 1mg/kg. The depressive-like behaviors of mice were evaluated by sucrose preference test (SPT), open field test (OFT) and forced swim test (FST). The changes of Nissl body in neurons of prefrontal cortex (PFC) were observed by Nissl staining. C-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphorylated JNK, Bax (Bcl-2 associated X protein), Bcl-2, caspase-3 in PFC area were detected by Western blot. **Results** The percentage of sweet water preference, total distance in OFT and crossing number in CUR group were higher than those in LPS group ($P < 0.05$), and immobility time in FST was lower than that in LPS group ($P < 0.05$). The results of Nissl staining showed that number of nerve cells in CUR group was more than that in LPS group ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression levels of p-JNK, Bax and caspase-3 were decreased in PFC area of CUR group while Bcl-2 were increased compared with the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin can improve the depressive behavior induced by LPS and reduce the damage of neurons, which may be related to the inhibition of JNK phosphorylation, the decrease of Bax and Caspase-3, and the increase of Bcl-2 expression.

Key words curcumin; LPS; depression; prefrontal cortex; p-JNK; apoptosis